

(54) RECOMBINANT PLASMID HOLDING HALOHYDRIN EPOXIDASE GENE AND MICROORGANISM TRANSFORMED WITH THE SAME PLASMID
 (11) 4-278089 (A) (43) 2.10.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-62631 (22) 4.3.1991
 (71) NITTO CHEM IND CO LTD (72) FUJIO TO(2)
 (51) Int. Cl^s. C12N15/53,C12N1/21,C12P17/12//(C12N15/53,C12R1/15)(C12N1/21, C12R1/19)(C12P17/12,C12R1/19)

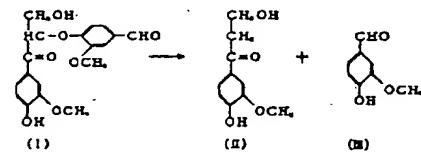
PURPOSE: To obtain a new recombinant plasmid useful for producing an epihalohydrin and a 4-halo-3-hydroxybutyronitrile.

CONSTITUTION: A recombinant plasmid, e.g. plasmid pST001 and pST005 prepared by linking a halohydrin epoxidase enzymic gene DNA derived from a microorganism to a vector plasmid. The exemplified plasmid is obtained by cloning a halohydrin epoxidase gene of *Corynebacterium* sp. N-1074 (FERM P-2643) into *Escherichia coli* JM109 strain and taking out a plasmid DNA from the resultant transformant having the halohydrin epoxidase gene.

(54) CLEAVING ENZYMIC GENE FOR ARYLGLYCEROL- β -ARYL ETHER TYPE BOND WHICH IS BOND BETWEEN PRINCIPAL UNITS OF LIGNIN
 (11) 4-278090 (A) (43) 2.10.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-123177 (22) 5.3.1991
 (71) KOBE STEEL LTD (72) YOSHIHIRO KATAYAMA(5)
 (51) Int. Cl^s. C12N15/53,C12N1/21//C12N9/04(C12N15/53,C12R1/38)(C12N1/21,C12R1/19)

PURPOSE: To obtain a new DNA fragment useful for mass-producing an enzyme for hydrolyzing lignin.

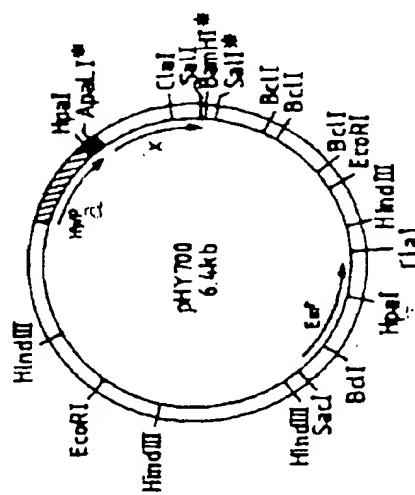
CONSTITUTION: A DNA fragment containing a gene instructing an enzyme (hereinafter referred to as etherase) capable of specifically cleaving an arylglycerol- β -aryl ether type bond which is a main intramolecular bond of lignin as shown in the formula in fragments prepared by cleaving a chromosomal DNA of a microorganism capable of producing the aforementioned etherase. For example, a DNA fragment of 20.5Kbp whole length capable of coding the etherase gene, containing 5 Sall cleavage sites in fragments prepared by cleaving a chromosomal DNA of *Pseudomonas·paucimobilis* wild strain (SYK-6 strain) with a restriction enzyme Sall and cleavable into respective fragments of 7.0, 4.4, 3.0, 2.6, 1.9 and 1.6Kbp. The aforementioned DNA fragment is obtained by cloning from the *Pseudomonas·paucimobilis* according to a genetic engineering technique.



(54) HIGHLY EXPRESSING VECTOR, MICROORGANISM HOLDING THE SAME HIGHLY EXPRESSING VECTOR AND PRODUCTION OF USEFUL SUBSTANCE USING THE SAME MICROORGANISM
 (11) 4-278091 (A) (43) 2.10.1992 (19) JP
 (21) Appl. No. 3-123183 (22) 5.3.1991
 (71) HIGETA SHIYOUYU K.K.(1) (72) SHIYOUGO EBISU(2)
 (51) Int. Cl^s. C12N15/75,C12N1/21,C12N9/28,C12N15/12,C12N15/56, C12P21/02//(C12N15/75,C12R1/08)(C12N1/21,C12R1/08)(C12N9/28, C12R1/08)(C12P21/02,C12R1/08)

PURPOSE: To obtain a new vector capable of highly expressing an exogenous product using *Bacillus·brevis* as a host microorganism.

CONSTITUTION: A highly expressing vector pHY700 expressed by a restriction enzyme map of the figure. The aforementioned highly expressing vector pHY700 is obtained by treating a well-known plasmid having a DNA fragment linking an α -amylase (BLA) gene of *Bacillus·licheniformis* to the downstream side of an MWP promoter gene of *Bacillus·brevis* 47 (FERM P-7224) with a restriction enzyme, linking a promoter region fragment of a main extracellular protein gene (HWP gene) of *Bacillus·brevis* HPD31 (FERM BP-1087) thereto, transforming the *Bacillus·brevis*, providing a plasmid in which the MWP promoter is converted into an HWP promoter, treating the resultant plasmid with a restriction enzyme, a ligase and a linker and removing a BLA genetic region.



a: promoter

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-278091

(43)公開日 平成4年(1992)10月2日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 N 15/75
1/21
9/28
15/12

識別記号
15/75
7236-4B
7823-4B
8828-4B

序内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 N 15/00
審査請求 未請求 請求項の数6(全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-123183

(22)出願日 平成3年(1991)3月5日

(71)出願人 000112060
ヒゲタ醤油株式会社
東京都中央区日本橋小網町2番3号
(71)出願人 000120205
鶴高 重三
愛知県名古屋市名東区植園町1丁目24番地
の3
(72)発明者 恵比須 省吾
千葉県銚子市清水町2798-1
(72)発明者 山形 秀夫
愛知県名古屋市千種区園山町2-22 园山
住宅1-305
(74)代理人 弁理士 戸田 親男

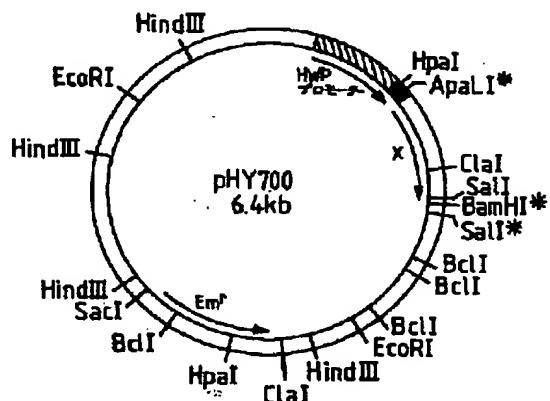
最終頁に続く

(54)【発明の名称】高発現ベクター及び該高発現ベクターを保有する微生物並びに該微生物を用いる有用物質の製造法

(57)【要約】

【構成】図で表わされる制限酵素切断図を有するプラスミド。このプラスミドは、バチルス・ブレビスHPD31 (Bacillus brevis HPD31) (FERM BP-1087) 由来のHWPプロモーター領域を有する。

【効果】このプラスミドは、HWPプロモーター領域の下流に目的とする各種の外来遺伝子を挿入して高発現ベクターとして使用できる。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 図5の制限酵素地図で示される高発現ベクターpHY700。

【請求項2】 図5の制限酵素地図で示される高発現ベクターpHY700に外来遺伝子を結合してなる高発現ベクターpHY700X。

【請求項3】 高発現ベクターpHY700Xを保有する微生物。

【請求項4】 高発現ベクターpHY700Xを保有するバチルス・ブレビス (Bacillus brevis)。

【請求項5】 高発現ベクターpHY700Xを保有するバチルス・ブレビス HPD31 (Bacillus brevis HPD31) (FERMBP-1087)。

【請求項6】 高発現ベクターpHY700Xを保有する微生物を培養することにより外来遺伝子産物を培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該産物の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、バイオテクノロジーに関するものであり、更に詳細には、本発明は、新規高発現ベクター及び高発現ベクターに外来遺伝子を結合してなるベクターをバチルス・ブレビスに保有せしめてなる微生物、並びに該微生物を培養し、培養物中に外来遺伝子産物を生成蓄積せしめこれを採取することを特徴とする該産物の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 鶴高らはバチルス・ブレビス (Bacillus brevis) にはプロテアーゼを生産しない菌株が多いことを見いだし、その1菌株バチルス・ブレビス47 (FERM P-7224:特開昭60-58074号公報、特開昭62-201589号公報参照) の主要菌体外タンパク質 (H. Yamagataら、J. Bacteriol., 169, 1239 (1987); 塚越規弘、日本農芸化学会誌, 61, 68 (1987) および特開昭62-201583号公報にそれぞれ "outer wall protein and middle wall protein"、"菌体外蛋白主要タンパク質" として記載されている。) 遺伝子のプロモーターおよび該主要菌体外タンパク質の1種であるMWタンパク質 (middle wall protein) のシグナルペプチドをコードする領域を用いて分泌ベクターを作製し、本菌株を宿主としてα-アミラーゼ (特開昭62-201583号公報、H. Yamagataら、J. Bacteriol., 169, 1239 (1987) やブタペプシノーゲン (鶴高重三、日本農芸化学会昭和62年度大会講演要旨集、p837-838; 塚越規弘、日本農芸化学会

10

20

30

40

50

2

誌、61, 68 (1987)) の分泌生産に成功している。

【0003】 また、高木らはバチルス・ブレビスの中でプロテアーゼを菌体外に生産しない菌株バチルス・ブレビスHPD31 (なお、この菌株は本明細書におけるバチルス・ブレビスH102 (FERM BP-1087) と同一菌株である) を分離し、これを宿主として耐熱性α-アミラーゼの高分泌生産 (Agric. Bio. I. Chem., 58, 2779-2380 (1989)) や、山形らによるヒトEGFの高分泌生産 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589-3593 (1989)) に成功している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 バチルス・ブレビスを宿主菌とする外来遺伝子産物の生産性については、遺伝子組換え技術を適用する以前の生産量及び大腸菌を宿主菌とする系に比べ飛躍的に向上しているが、産業上必要な量を安価に供給するにはもう一段の技術開発が必要とされている。従来、バチルス・ブレビスを宿主菌とする系で使用しているベクターは、Staphylococcus aureus由来のpUB110をベースとするもので、バチルス・ブレビス内に安定に保持するためには抗生物質等の薬剤の存在が必須であること、また高コピーブラスミドであり、短期間に多量の遺伝子発現が起こるために、宿主菌であるバチルス・ブレビスに重大なダメージを与え、結果として、遺伝子産物の生産が少ないと言うことが頻繁に認められ、より安定でかつ宿主菌と適合性、調和性のよいベクターの開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記した業界のニーズに加え、更に、バチルス・ブレビスが汎用性の高い宿主として利用可能であること、また同菌がコンピテントな菌を冷凍保存できること、そしてまた電気パルス法等により形質転換が容易であること等に鑑み、バチルス・ブレビスの工業的有用性に着目して、バチルス・ブレビスで安定でかつ高発現のベクターを開発すべく観察検討した結果、バチルス・ブレビス由来のプラスミドを利用し、且つ、バチルス・ブレビス由来の強力なプロモータを用いて非常に有効なベクターを構築することに成功し本発明を完成した。

【0006】 すなわち本発明は、バチルス・ブレビスで高発現するベクターに関するものである。また更に、本発明はこのベクターに目的とする外来遺伝子を連結してなる高発現ベクター、それを保有する形質転換体、及びこの形質転換体を培養することによる外来遺伝子産物の大量分泌生産方法にも関するものである。以下、本発明について詳しく説明する。

【0007】 本発明の高発現ベクターの構築に使用するプラスミドはバチルス・ブレビス由来のプラスミドであ

3

れば何れでも良いが、例えば、パチルス・プレビス481 (FERM P-7531) より調製されるプラスミドpWT481が有効に使用される。プラスミドの調製は既知の方法例えば田中らの方法 (J. Bacteriol., 129, 1487-1494 (1977)) が挙げられる。

【0008】プロモーターとしてはパチルス・プレビスで機能するものであれば何れでも良いが、パチルス・プレビス由来のプロモーターが好ましく、例えばパチルス・プレビスHPD31 (FERM BP-1087) の主要菌体外タンパク質遺伝子 (HWP遺伝子) のプロモーターなどが挙げられる。プロモーター領域を含有するDNAは上記プロモーター以外にSD配列、翻訳開始コドンなどを有していることが必要である。

【0009】上記のように、パチルス・プレビスHPD31のHWPプロモーター領域を含有するDNAは既知であるので (J. Bacteriol., 172, 1312-1320 (1990))、必要部分を制限酵素で切断しておき、これをサブクローニング用ベクター (形質転換体としてE. coliを用いる場合には、pUC118, pUC119等のpUC系プラスミド又はpBR322系のプラスミドが好適である) に挿入し、そのDNAでE. coliを形質転換しておけば、目的とするプロモーター領域を含有するDNAが保存される。したがって必要ある場合に、形質転換体からプラスミドを取り出し、必要あれば更に制限酵素処理、リンカー処理等を行ってプラスミドを調製しておけば、目的とするプロモーターを含むDNA断片を自由に取り出すことができる。

【0010】また、本発明の高発現ベクターに連結する外来遺伝子はパチルス・プレビスで発現可能な遺伝子であれば何れでも良く、例えば、*Bacillus subtilis*のα-アミラーゼ遺伝子、ヒトEGF遺伝子等が挙げられる。

【0011】プラスミドを構築する方法としては、常法が適宜用いられ、例えばモレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) に記載の方法などが例示される。

【0012】パチルス・プレビス47 (FERM P-7224) のMWPプロモーター領域の下流にパチルス・リケニフォルミスのα-アミラーゼ (BLA) 遺伝子を連結したDNAフラグメントを保有するプラスミドは既知であるので (J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987))、これに制限酵素処理した後、上記によって調製したプラスミドから取り出したHWPプロモーター領域断片をつないでパチルス・

4

プレビスを形質転換して、MWPプロモーターがHWPプロモーターにかわったプラスミドを得る。このプラスミドを制限酵素処理、リガーゼ処理、リンカー処理することによつてBLA遺伝子領域を除去した本発明の目的とする高発現ベクターpHY700が得られる。

【0013】このようにして調製した高発現ベクターpHY700のHWPプロモーター、シグナルペプチドの下流側に、目的とする外来遺伝子を常法にしたがつてframe挿入し、微生物を形質転換すれば、外来遺伝子を多量に分泌生産しうる形質転換体を得ることができる。

【0014】外来遺伝子を組み込んだベクターで形質転換する微生物としては、パチルス・プレビスに属する微生物であれば何れでも良く、例えば、パチルス・プレビス47 (FERM P-7224)、パチルス・プレビスHPD31 (FERM BP-1087) が挙げられるが、好適にはパチルス・プレビスHPD31が用いられる。パチルス・プレビスを形質転換する方法は、公知の方法で良く、例えば、Takahashiらの方法 (J. Bacteriol., 156, 1130 (1983)) またはTakagiらの方法 (Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100 (1989)) 等が例示される。

【0015】得られた形質転換体の培養に用いる培地は、形質転換体が生育して目的とする外来遺伝子産物を产生しうるものであれば如何なるものでも良い。

【0016】該培地に含有される炭素源としては、例えばグルコース、シュークロース、グリセロール、澱粉、デキストリン、糖蜜、尿素、有機酸などが考えられる。該培地に含有される窒素源としては、カゼイン、ボリペプトン、肉エキス、酵母エキス、カザミノ酸、グリシンなどの有機窒素源、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの無機窒素源などが用いられる。その他、塩化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩が必要に応じて培地に加えられる。また、糖と無機窒素源を主とする合成培地を用いて培養しても良い。栄養要求性を示す菌は、その生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸、塩類などが挙げられる。

【0017】また、培養に際して必要があれば、培地に抗生物質例えはペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、パシトラシン、D-サイクロセリン、アンピシリンなどが加えられる。更に必要により、消泡剤例えは大豆油、ラード油、各種界面活性剤などを培地に加えてもよい。

【0018】培地の初発pHは5.0~9.0であり、さらに好ましくは6.5~7.5である。培養温度は通常15℃~42℃、さらに好ましくは24℃~37℃であり、培養時間は通常16~166時間、さらに好まし

くは24~96時間である。

【0019】培養終了後、それ自体公知の方法、例えば遠心分離、ろ過などで菌体と上清とを分離する。

【0020】形質転換する微生物として、例えばバチルス・プレビスHPD31等を使用すれば、電気パルス法等によって容易に形質転換することができるのみでなく、目的とする産物を菌体外に生産するというすぐれた性質を有しているので、上記のようにして得られた培養上清に含まれる外来遺伝子産物は、例えば塩析、等電点沈殿、ゲル濃過、イオン交換クロマトグラフィ、ハイドロオキシアバタイト、高速液体クロマトグラフィーなどに従って精製すればよく、このようにして目的とする外来遺伝子産物を容易に得ることが出来る。

【0021】以下、本発明を実施例により更に詳しく説明する。

【0022】

【実施例1】

【0023】[(1) HWPプロモーターの調製(図1)] *Bacillus brevis* HPD31の細胞壁構成タンパク質(HWP)遺伝子の5'上流域(全プロモーター領域)と構造遺伝子の約半分を含むDNA断片を有するファージφ-SK10(*J. Bacteriol.*, 172, 1312-1320(1990))よりDNAを調製し(Molecular Cloning(1982))、そのDNAを制限酵素C1aIとHpaIで消化し、HWP全プロモーターとそのシグナルペプチドの一部を含む640bp断片を得た。予めpUC119をSmaIで消化後、HpaIリンカーを挿入し pUC119-HpaIを作製した。pUC119-HpaIをAccIとHpaIで消化し、その3.1kb断片と先に得た640bp C1aI-HpaI断片をT4リガーゼを用いて連結し、そのDNAを大腸菌JM109(Molecular Cloning(1982))の形質転換に用い、その形質転換体からpSK31Pを得た。pSK31PはpUC119-HpaIのAccI-HpaIサイトに640bp C1aI-HpaI断片が正しく挿入されていることをDNAの塩基配列を決定して確認した。次にpSK31PをPvuIIで消化後BamHIリンカーを付加し、pSK31PBMを得た。pSK31PBMからはHWPプロモーター及びシグナルペプチドの一部を820bp BamHI-HpaI断片として取り出せる。

【0024】[(2) pHY700の構築(図2)] *Bacillus brevis* 47(FERM P-7224)のMWPプロモーター及びシグナルペプチド(*J. Bacteriol.*, 169, 1239-1245(1987))の下流に*B. licheniformis*のα-アミラーゼ(BLA)遺伝子(*J. Biochem.*, 96, 1147-1156(1985))

を直結し、*B. brevis*で安定に保持されるプラスミドpHY481(*Appl. Env. Microbiol.*, 49, 1076-1079(1985))に挿入したプラスミドpHY4831(*J. Bacteriol.*, 169, 1239-1245(1987))をBamHIで完全消化後、HpaIで部分消化し、(MWPプロモーター及びシグナルの一部が除かれた)5.5kb BamHI-HpaI断片を得た。(1)で得たpSK31PBMをBamHIとHpaIで処理し、HWPプロモーター及びシグナルの一部を含む820bp BamHI-HpaI断片を得、先に得た5.5kb断片とT4リガーゼを用いて連結し、そのDNAを*B. brevis* HPD31の形質転換に用いた。得られた形質転換株からpHY4831Hを得た。pHY4831HはMWPプロモーターがHWPプロモーターに変わったプラスミドである。次いでpHY4831HをBamHIで消化後、DNAポリメラーゼにより平滑末端化した後T4リガーゼにてその平滑末端部分を連結しBamHI切断点を無くし、次いでそのプラスミドをSalIで消化後、DNAポリメラーゼにより平滑末端化した後BamHIリンカーを付加し pHY700を得た(図5)。pHY700のX部分に外来(目的)遺伝子をアミノ酸の読み取りが合う様に(in frame)挿入し、*B. brevis* HPD31を形質転換することにより、プラスミドpHY700X(図5)を保有し目的の遺伝子産物を多量に分泌生産する組換え体を得た。

【0025】【実施例2. pHY700BLAの構築(図3)] pHY4831をApalIとBclIで消化し、MWPのシグナルペプチドの一部と*B. licheniformis*のα-アミラーゼ遺伝子を含む1.7kb ApalI-BclIフラグメントを得た。pHY700をApalIとBamHIで消化し、5.4kb ApalI-BamHIフラグメントを得、これと先に得た1.7kbフラグメントをT4リガーゼにて連結し、*B. brevis* HPD31を形質転換した。組換え体よりプラスミドpHY700BLAを得た。

【0026】【実施例3. pHY700BLAを用いてのBLAの分泌生産】pHY700BLAを保持する*B. brevis* HPD31を5' PY培地(*Agric. Biol. Chem.*, 53, 2279-2280(1989))に植え、30℃で8日間振とう培養した。上記の培養液を遠心分離し、その上清のアミラーゼ活性を可溶性デンプンを基質として斎藤の方法(*Arch. Biochem. Biophys.*, 155, 290-298(1973))を用いて測定し、下記の表1の結果を得た。

【0027】

【表1】

BLAの生産

	4	8 (日)
B. brevis HPD31	0	0
B. brevis HPD31/	2.4	3.7 ($\times 10^6$ U/ml)
pHY700BLA		

【0028】培養上清から α -アミラーゼを山形らの方法 (J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987)) に従い SDS-PAGE 上一本のシングルバンドになるまで精製を行った。本アミラーゼ精製品の比活性は 1×10^6 U/mg protein であり、上記培養液 (pHY4831H-8日) には 3.7 g/L のアミラーゼが分泌されていることになる。

【0029】【実施例4. pHY700EGFの構築 (図4)】pNU200EGFを保持する B. brevis 201s47-5 (Bacillus brevis 47-5 (pNU200-EGF), FERM BP-1771) から Molecular Cloning 中のアルカリ抽出法により単離したプラスミド pNU200EGF を ApaLI と BamHI で消化し、MWPシグナルペプチド (J. Bacteriol., 169, 1239-1245 (1987)) の一部及びEGFを含む 200 bp のDNA断片を得た。pHY700を ApaLI と BamHI で消化し 5.2 kb の断片を得、これと先* h-EGFの生産

*の 200 bp の断片を T4リガーゼを用いて連結後、 B. brevis 47 を形質転換した。形質転換体より pHY700 に EGF 遺伝子が正しく挿入された pHY700EGFを得た。pHY700EGFを保持する B. brevis 47 よりアルカリ抽出法により pHY700EGFを得、これを用いて、Takagiらの方法 (Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100 (1989)) により B. brevis HPD31 を形質転換し、B. brevis HPD31 (pHY700EGF) が得られた。

【0030】【実施例5. h-EGFの生産】上記で得られた形質転換体 B. brevis HPD31 (pHY700EGF) 及び対照となる B. brevis HPD31 を 5' PY 培地を用いて 30°C で 6 日間振とう培養を行った。その培養液を遠心分離し、上清のヒトEGF濃度を抗ヒトEGF血清を用いたELISA法により求めた。その結果を下記の表2に示す。

【0031】

【表2】

	2	4	6 (日)
B. brevis HPD31	0	0	0
B. brevis HPD31/	0.32	0.87	1.13 (g/L)
pHY700EGF			

【0032】

【発明の効果】本発明により、バチルス・ブレビス由来の高発現ベクターを開発した。この高発現ベクターは目的とする外来遺伝子を挿入することができるるので、このベクターにより形質転換した微生物を培養することにより、目的とする各種の外来遺伝子産物を菌体外に大量分泌生産することができる。

40 【図面の簡単な説明】

【図1】HWPプロモーターの調製図である。

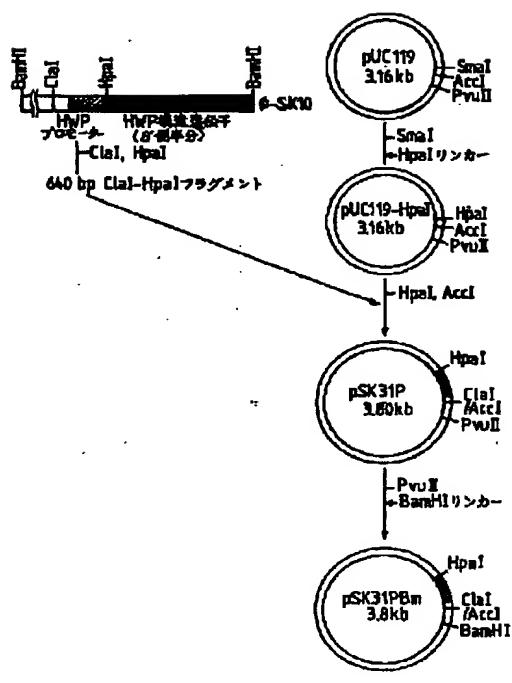
【図2】pHY700の構築図である。

【図3】pHY700BLAの構築図である。

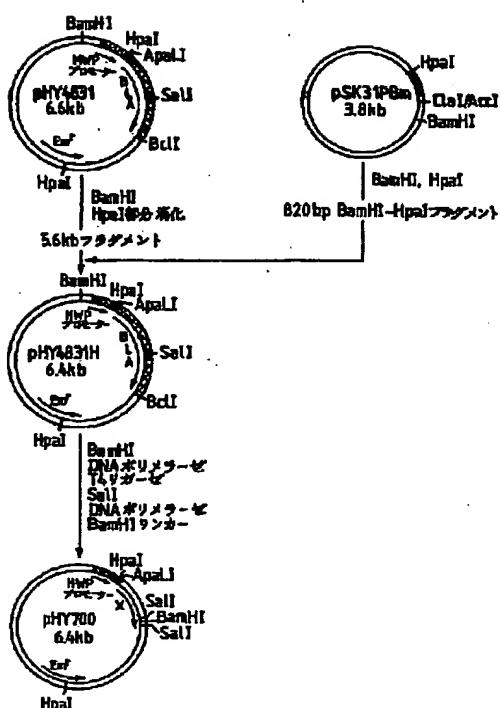
【図4】pHY700EGFの構築図である。

【図5】高発現ベクター pHY700 (X) の制限酵素切断地図である。

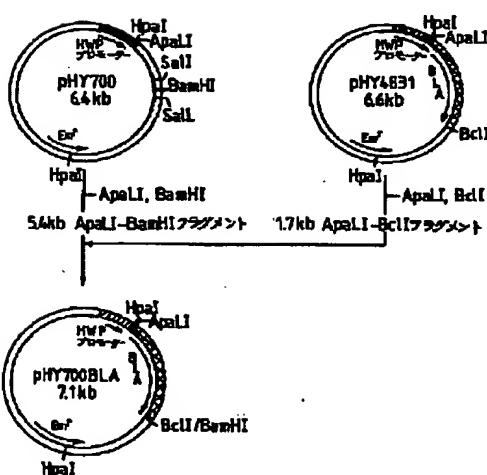
【図1】



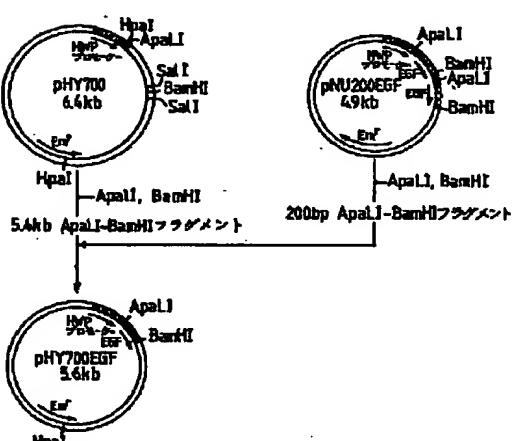
【図2】



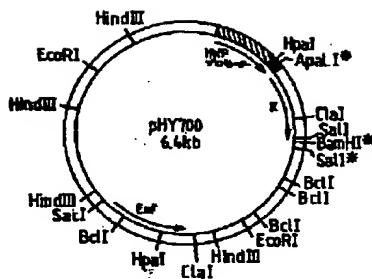
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/56				
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
//(C 1 2 N 15/75				
C 1 2 R 1:08)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:08)				
(C 1 2 N 9/28				
C 1 2 R 1:08)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:08)				

(72)発明者 鶴高 重三
愛知県名古屋市名東区植園町1-24-3